

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロテアーゼ阻害剤及び疾患の予防又は治療剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性閉塞性肺疾患の病因の一つと考えられるプロテアーゼの阻害剤、及び慢性閉塞性肺疾患、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

慢性閉塞性肺疾患 Chronic Obstructive Pulmonary Disease: (以下、「COPD」と記載する。) とは、肺気腫、慢性気管支炎、あるいは両者の併存により、進行性の閉塞性換気障害を特徴とする疾患である。COPDにおける気流制限は、末梢気道病変における気道抵抗上昇と肺気腫による肺弾性収縮力低下に因り、2者の関与の程度は症例によって様々ではあるが、COPD患者の多くは肺気腫優位の傾向を示す。肺気腫の最大のリスクファクターが喫煙である事は多くの疫学的研究より明らかである。2001年に米国 National Heart, Lung and Blood Institution (NHLBI) と World Health Organization (WHO) との共同で報告された Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) にも述べてるように、1990年の調査では世界での COPD の罹患率は、全人口に対し、男性で 9.34/1000, また女性では 7.33/1000 となっており、罹患率が非常に高い疾患である。現時点での COPD による呼吸不全が原因の死亡は、アメリカの死因の4位と推定されている。また、日本における厚生労働省の報告でも COPD による死亡率は、最近の30年間で約4倍に増加した。COPD 治療薬として従来知られているのは、気管支拡張剤とステロイドもしくはこの組み合わせである。しかしながらあまり効果がなく、新規の治療薬が求められている。また、臭化チオトロピウム水和物も上市されているが、さらに有効な薬剤が求められている。

【0003】

このため、COPD の根治的治療薬及び治療法はいまのところ確立されていない。

【0004】

【非特許文献1】 Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R., and Hurd, S. S. "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary." 「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.163: PP.1256-1276, 2001.

【非特許文献2】 Barnes, P. J. "Novel approaches and targets for treatment of chronic obstructive pulmonary disease." 「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.160: S72-79, 1999.

【0005】

また、肺胞蛋白症とは肺胞腔内にサーファクタント蛋白とリン脂質が集積する原因不明の疾患である。近年、90%を占める特発例で GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor : 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子) の活性を抑制する自己抗体の存在が示されたが、現在のところ根治的治療法がなく、気管支鏡下で肺胞を生理食塩水によって洗浄するぐらいしか治療法はない。

【0006】

そして、COPD を含む慢性肺疾患による右心負荷が原因となって起こる肺性心等の心不全や、それに続く肝不全、肺高血圧症等の循環不全等が、COPD に関連する循環器疾患として知られている。

【0007】

このため、COPD、肺胞蛋白症、循環不全(肝不全、心不全、肺高血圧症等)の根治的治療薬及び治療法が求められている。

【0008】

BEST AVAILABLE COPY

また、1980年代、エイズ（免疫不全症候群）に感染した患者のほとんどは死を免れなかった。HIV（ヒト免疫不全ウイルス）と呼ぶウイルスがCD4（抗原蛋白の一種で、分子量59kDaの単鎖膜貫通型d糖タンパク。）陽性細胞に感染し体の免疫系が破壊され、体力が弱って消耗し、死に至る。

【0009】

しかし、近年米国をはじめ先進各国では、HIV感染者の運命は劇的に様相が違ってきた。1996年7月にカナダのバンクーバーで開かれた国際エイズ会議では、関係者に希望を抱かせる発表が相次いだ。例えばニューヨークにあるアーロン・ダイヤモンド・エイズ研究センターのホー（David Ho）は、プロテアーゼ阻害剤とすでに1991年以降に市場に出回ようになっていたAZT（ジドブジン、逆転写酵素阻害剤の一種）タイプの抗ウイルス剤とを組み合わせたカクテル療法（人体内でHIVが増えるのを邪魔する薬を複数使用して、AIDSの発症を抑さえる方法）によって、非常に優れた結果が得られたと報告した。また、カクテル療法の中でも、HAART療法（高活性抗レトロウイルス療法）等が注目されている。

【0010】

このカクテル療法は、根本治療にはならないものの、エイズ患者の免疫細胞を増やすだけでなく、血液中のウイルス数を検出限界以下にまで減らしたことが報告された。

【0011】

AZT、d4T（スタブジン、逆転写酵素阻害剤の一種）、ddI（ジダノシン、逆転写酵素阻害剤の一種）のような以前からの逆転写酵素阻害剤薬と一緒に服用すると、これらのプロテアーゼ阻害剤は最も有効に働くことが知られている（いわゆる抗HIV療法（highly active antiretroviral therapy）HAART療法）。事実、1996年から1998年の間に、米国ではHIV感染に伴う死者が70%以上も減り、エイズは死因の上位10位から外れた。エイズの死亡率は統計がとられるようになった1987年以降、1998年に最低となり、更に低下する見通しである。

【0012】

1995年12月、米食品医薬品局（FDA）は最初のプロテアーゼ阻害剤「サキナビル」を認可した。1996年春までには、さらに2つの阻害剤「リトナビル」と「インジナビル」が認可された。しかしながら、HIVプロテアーゼ阻害剤は、阻害作用は優れているものの副作用が多いという欠点を有している。

【0013】

ところで、HIV患者の血清中にチオレドキシンが著明に発現している（Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2688-93）ことが分かっているが、今のところその意義は明らかになっていない。

【0014】

一方、エラスターゼは、肺を構成する弾性線維（elastic fiber）の主成分である不溶性タンパク質エラスチンを加水分解するプロテアーゼとして知られている。このエラスターゼは、気管内へ投与することによって、COPDの一種である肺気腫を誘導することが古くから知られており、エラスターゼ投与動物が、肺気腫の動物モデルとして用いられている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

我々は、上記の通り、エラスターゼが肺気腫を引き起こすことに鑑み、エラスターゼ等に代表されるプロテアーゼの阻害が、COPDの一種である肺気腫の治療に役立つのではないかという仮説に基づき、プロテアーゼ阻害剤を探索し、また得られたプロテアーゼ阻害剤であるレドックス活性蛋白質が、実際にCOPDを強力に抑制することや、免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいはHAART療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼ阻害剤として使用できる可能性を見出し、更に、レドックス活性蛋白質が、ある種のIL-18阻害活性を有していることから、他のIL-18阻害剤のCOPD治療薬への可能性に思い至り、本発明を完成するに至ったものであって、その目的とするところは、エラスター

ーゼを含むプロテアーゼの阻害剤、引いては COPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症を伴う循環不全等の循環器疾患の根治的治療薬及び治療法を提供するにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上述の目的は、[1] 下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤、[2] プロテアーゼがメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼから選択されるものである、当該プロテアーゼ阻害剤、[3] 下記(1)乃至(4)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤、[4] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤、[5] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、肺胞蛋白症の予防又は患治療剤、[6] 下記(5)乃至(8)から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、循環器疾患の予防又は治療剤によって達成される。

【0017】

- (1) レドックス活性蛋白質
- (2) レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質
- (3) (1) をコードする遺伝子
- (4) (2) をコードする遺伝子
- (5) インターロイキン18阻害剤
- (6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質
- (7) (1) をコードする遺伝子
- (8) (2) をコードする遺伝子

【発明の効果】

【0018】

本発明のレドックス活性蛋白質又はその遺伝子を含むプロテアーゼ阻害剤、及び COPD の予防又は治療剤は、COPD を強力に抑制することができる他、免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいは HAART 療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼとして使用可能である。レドックス活性蛋白質又はその遺伝子は、もともと生物細胞中に存在するものであるため、従来免疫不全症候群のカクテル療法に用いられているプロテアーゼ阻害剤のような副作用が無いという利点を有している。また本発明の IL-18 阻害剤又はその遺伝子を含む疾患の予防又は治療剤は、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症等を伴う循環不全等の循環器疾患を、効果的に治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】実施例2の第1群(controlマウス)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)

【図2】実施例2の第2群(病態マウスモデル1)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)

【図3】実施例2の第3群(病態マウスモデル2)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)

【図4】実施例2の第4群(病因+治療剤投与マウス)の肺組織の顕微鏡画像である(HE染色, ×40倍)

【図5】実施例2の第1～4群のマウスの、平均の肺胞の長さ(mean linear intercept: Lm)を表す図である。

【図 6】実施例 3 の SPC-IL-18TG マウスに、PBS を投与した群（コントロール）の肺組織の顕微鏡画像である（H E 染色，× 4 0 倍）

【図 7】実施例 3 の SPC-IL-18TG マウスに、TRX を投与した群の肺組織の顕微鏡画像である（H E 染色，× 4 0 倍）。

【図 8】参考例 1 の、健常人肺の肺組織における、IL-18 の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫染色，× 4 0 0 倍）。

【図 9】参考例 1 の、COPD 患者の肺組織における、IL-18 の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 4 0 倍）。

【図 1 0】参考例 1 の、COPD 患者の肺組織における、IL-18 の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 2 0 0 倍）。

【図 1 1】参考例 2 の、健常人の肺組織における、T R X の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 4 0 倍）。

【図 1 2】参考例 2 の、健常人の肺組織における、T R X の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 2 0 0 倍）。

【図 1 3】参考例 2 の、COPD 患者の肺組織における、T R X の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 4 0 倍）。

【図 1 4】参考例 2 の、COPD 患者の肺組織における、T R X の発現量を示す、免疫組織染色の結果を示す図である（免疫組織染色，× 2 0 0 倍）。

【図 1 5】シグナルペプチドを持つ成熟 IL-18 c D N A のシーケンス（DNA 配列）である。

【図 1 6】本発明で用いられる組換え遺伝子 SPC-IL-18SP である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 0 】

〈プロテアーゼ〉

プロテアーゼとは、蛋白質分解酵素のことであるが、例えば、メタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ）等が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

メタロプロテアーゼとは、亜鉛などの重金属を活性中心に持つタンパク質分解酵素であり、マトリックス・メタロプロテアーゼ（以下、「MMP」と記載する。）やサーモリシン等が挙げられる。

MMPとは、動物細胞の細胞間の接着性マトリックス・タンパク質を加水分解し、細胞分裂や形態形成、さらにはガン転移に関与している亜鉛含有プロテアーゼである。MMPとしては、MMP-1，2，・・・28等30種類近くが同定されている。

【 0 0 2 2 】

システインプロテアーゼとは、システイン残基を活性中心に持つプロテアーゼであり、カスパー、ゼ、パpain(papain)等が挙げられる。カスパーゼとしては、カスパーゼ-1，2，3・・・等20種類近くが挙げられるが、中でもカスパーゼ-1，-3や-9が、本発明のプロテアーゼ阻害剤のターゲットとして重要である。

【 0 0 2 3 】

カスパーゼは、アスパラギン酸のC末端側を切断するが、不活性型前駆体として存在し、アポトーシスのシグナルにより切断されて活性型になるものである。具体的には、カスパーゼ-1等が挙げられ、これはインターロイキン1β変換酵素とも呼ばれ、IL-18前駆体を切断し、活性型のIL-18とすることも知られている。

【 0 0 2 4 】

セリンプロテアーゼとしては、エラスターゼの他、キモトリプシン(chymotrypsin)やサブチリシン(subtilisin)等が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

エラスターゼとは、肺を構成する弾性線維（elastic fiber）の主成分である不溶性タンパク質エラスチンを加水分解するプロテアーゼとして知られている。

【0026】

アスパラギン酸プロテアーゼとしては、ペプシン(pepsin)やカテプシン D(cathepsin D)等が挙げられる。

【0027】

〈本発明のプロテアーゼ阻害剤、及び COPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環不全（肝不全、肺性心等の心不全や肺高血圧症）等の循環器疾患の予防又は治療剤〉

【0028】

（レドックス活性蛋白質）

本発明のプロテアーゼ阻害剤、及び COPD 又は免疫不全症候群の予防又は治療剤の有効成分として用いられるものとしては、下記（１）乃至（４）単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

（１）レドックス活性蛋白質

（２）レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質

（３）（１）をコードする遺伝子

（４）（２）をコードする遺伝子

【0029】

レドックス活性蛋白質と同等の活性とは、下記に示す、レドックス制御活性を言う。

【0030】

レドックス活性蛋白質とは、レドックス（酸化と還元，reduction-oxidation）の両方の活性を有することによって、レドックス制御（酸化還元状態を調節すること）のできる蛋白質であり、レドックス活性ペプチド等をも含むものである。例えば、チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド類や、HO-1（ヘムオキシゲナーゼ-1）等が挙げられる。

【0031】

チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド類とは、チオレドキシシン（以下「TRX」と記載する。）ファミリーに属するポリペプチド類（以下、「TRX-P」と記載する。）とは、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を有するポリペプチド類であって、もともと、生物細胞中に存在するポリペプチド類である（特開2002-17958等参照）。

【0032】

本発明で言う「TRX-P」には、天然のヒトを含む動物、植物、大腸菌、酵母からの抽出ポリペプチド類以外に、遺伝子組み換えにより酵母や大腸菌等から抽出されるポリペプチド類、化学合成で作成されるポリペプチド類等も含まれる。但し、ヒト由来のもの、及びそれを大腸菌、酵母において遺伝子組み換えで作成したもの、及びそれらと同一又は類似の配列からなる合成ペプチドが、生体に与える影響がより少ないと考えられるため好ましい。

【0033】

TRX-Pは、システイン残基を含む活性部位（-Cys-X1-X2-Cys-：X1，X2は、アミノ酸残基を表し、同一であっても異なるものでも良い。）を有し、類似の3次元構造を持つ分子群である。従って、本発明で言う「TRX-P」には、上記の他、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸が欠失又は置換されたものや、他のアミノ酸、ペプチドが融合されたものであっても良い。

【0034】

活性部位の具体例としては、-Cys-Gly-Pro-Cys-，-Cys-Pro-Tyr-Cys-，-Cys-Pro-His-Cys-，-Cys-Pro-Pro-Cys-等が挙げられるが、中でも、-Cys-Gly-Pro-Cys-が、種を超えて保存されている配列であるため、マウスモデルによる実験結果の人間への応用がより確実であるという理由で好ましい。

【0035】

「TRX-P」には、具体的には、例えば、活性部位が-Cys-Gly-Pro-Cys-である

チオレドキシン (TRX), グルタレドキシン等が挙げられる。

【0036】

TRXには、ヒト、大腸菌、酵母由来のものがあり、グルタレドキシンには、ヒト、大腸菌由来のものがある。

【0037】

ヒト細胞から「TRX-P」を抽出する具体的な方法としては、以下の方法が例示される。

- (A) ヒト由来の細胞株から抽出する方法 (特開平1-85097号公報等参照)。
- (B) 遺伝子組み換え法を用いる方法 (特開平1-85097号公報等参照)。
- (C) ペプチド合成法を用いる (特開平5-139992号公報等参照)。

【0038】

(IL-18 阻害剤)

本発明の COPD, 肺胞蛋白症, 循環器疾患の予防又は治療剤の有効成分として用いられるものとしては、下記 (5) 乃至 (8) 単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

(5) インターロイキン18阻害剤

(6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1) をコードする遺伝子

(8) (2) をコードする遺伝子

【0039】

本発明の IL-18 阻害剤としては、IL-1 β 変換酵素阻害剤を含むシステインプロテアーゼ阻害剤等の、IL-18 前駆体から活性型 IL-18 への変換を阻害する物質、IL-18 結合蛋白質 (IL-18 binding protein (IL-18BP) グループ等)や抗 IL-18 抗体等の、IL-18 の活性を中和する物質、リコンビナント型 (The Combination of Soluble IL-18R α and IL-18R β Chains Inhibits IL-18-Induced IFN- γ (Journal of Interferon and cytokine research 22:P.593-601, 2002, Mary and Liebert, Inc.)) 又は天然型の可溶化 IL-18 レセプター (WO2005/12352) 等の IL-18 受容体への IL-18 の結合を阻害する物質、IL-18 受容体結合後のシグナル伝達の阻害剤等、又はこれらをコードする遺伝子等が挙げられる。

【0040】

IL-1 β 変換酵素阻害剤 (ICE) としては、種々の化合物が知られている。IL-1 β 前駆体中の、ICE と親和性を有する部位に類似するペプチド類等が挙げられ、例えば、IL-1 β 前駆体切断部位の Asp116 から N 末端側へかけての 4 アミノ酸からなるペプチド (Tyr-Val-Ala-Asp) 配列を有するペプチド類が、ICE の IL-1 β 前駆体への結合を阻害するとして知られている (特開許平 11-147895 号公報, [0002] の [従来技術] 参照)。また、具体例として、例えば、特開平 5-255218 号公報に記載のペプチド誘導体、特開平 11-147873 号公報に記載のスルホンアミド誘導体、特表平 10-504285 号公報に記載のペプチド誘導体、特開平 11-147895 号公報に記載のグリシン誘導体および国際出願 WO 97/24339 号公報に記載のテトラゾール誘導体等が挙げられる。

【0041】

IL-18 結合蛋白質 (IL-18BP) とは、[Immunity, 10, 127-136 (1999)] に記載された蛋白質及びそのサブクラス、すなわち当該文献の P.136 末尾に記載された GenBank accession number AF110798 で表される遺伝子がコードする IL-18 結合蛋白質またはそのサブクラスを意味する。サブクラスとしては、例えば当該文献記載の GenBank accession number AF110799, AF110800, AF110801, AF110802, AF110803, AF110460 等で表される遺伝子がコードする蛋白質が挙げられる。これらは、文献 [Immunity, 10, 127-136 (1999)] に記載の方法に準じて調製することができる。

【0042】

IL-18 に特異的なモノクローナル抗体は、文献 [J. Immunol. Methods, 217, 97-102 (1998)]

に記載の方法に準じて調製することができる。

【0043】

IL-18 受容体への IL-18 の結合を阻害する物質の具体例としては、例えば、IL-18 受容体蛋白質および IL-18 の受容体に特異的なモノクローナル抗体等を挙げることができる。IL-18 の受容体に特異的なモノクローナル抗体としては、Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31:619-625, 2004.に報告してあるように H44 モノクローナル抗体 (Human IL-18R (α chain)に対する抗体) 等が挙げられる。

【0044】

上記 IL-18 の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、哺乳動物由来の抗体、キメラ抗体又は擬人化抗体のいずれであっても良い。

【0045】

本発明に用いられる IL-18 受容体蛋白質および IL-18 の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、例えば、特開平 11-100400 号公報に記載の方法に準じて調製することができる。

【0046】

IL-18 受容体結合後のシグナル伝達の阻害剤としては、Myd88, IRAK (IL-1receptor-associated kinase), TRAF 6 (TNF receptor-associated Factor), TAK-1 (TGF- β activated kinase), MAPKK3,4,6 (MAP kinase kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38, NIK (NF- κ B-inducing kinase), IKK (I κ B-kinase), 等の IL-18 のシグナル伝達分子を、阻害する物質が挙げられ、例えば p38MAP キナーゼ阻害剤である SB203580, SB220025, RWJ 67657 (*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol.160 pp S72-S79, 1999), NF- κ B 阻害剤である、I- κ B inhibitor, I- κ B α gene transfer (*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol.160 pp S72-S79, 1999) や PS-341 (*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* vol.95 PP.15671-15676, December 1998 *Medical Sciences*) 等が挙げられる。

【0047】

尚、本発明で用いられる IL-18 阻害剤としては、上記の IL-18 阻害剤そのものの他、IL-18 阻害剤がポリペプチドの場合には、それをコードする遺伝子の他、IL-18 阻害剤のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ IL-18 阻害活性を有するタンパク質、あるいは、これらをコードする遺伝子も含まれる。

【0048】

本発明の COPD の予防又は治療剤の有効成分としては、上記のレドックス活性蛋白質に関連する物質 ((1) 乃至 (4)) と IL-18 阻害剤に関連する物質 ((5) ~ (8)) を、組み合わせて用いることもできる。

【0049】

本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤中の、有効成分の含有量は、剤形によって様々であり、一概に限定できず、各種剤形化が可能な範囲で、投与量との関係で適宜選択すれば良いが、例えば液剤の場合、0.0001~10 (w/v %), 好ましくは 0.001~5 (w/v %), 特に注射剤の場合、0.0002~0.2 (w/v %), 好ましくは 0.001~0.1 (w/v %), 固形剤の場合、0.01~50 (w/w %), 好ましくは 0.02~20 (w/w %) 等として調製できるが、必ずしもこの範囲に限定されるものではない。

【0050】

本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤の投与量は、投与経路、症状、年齢、体重、予防又は治療剤の形態等によって異なるが、例えば、プロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤中の有効成分の量が、処置を必要としている対象体重 1 kg 当たり 0.005~500 mg, 好ましくは、0.1~100 mg, 但し、成人に対して 1 日あたり、

下限として0.01mg（好ましくは0.1mg）、上限として、20g（好ましくは2000mg、より好ましくは500mg、更に好ましくは100mg）となるように、1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

【0051】

本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤は、従来知られている本発明の目的とする疾患の予防又は治療成分との合剤としても良い。その予防又は治療成分としては、以下の1. - 5. 等が挙げられる。

【0052】

1. メディエーターアンタゴニスト：

例えば、LTB4 antagonists（例えば LY29311, SC-53228, CP-105,696, SB201146, BIIL284）、5-Lipoxygenase inhibitors（例えば zileutin, Bayx1005）、Chemokine inhibitors、IL-8 antagonists（例えば SB225002; CXCR2 antagonists）、TNF inhibitors（例えば monoclonal Ab, soluble receptors, MMP inhibitors）、Antioxydants（例えば NAC, NAL, グルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼ等）、Prostanoid inhibitors（例えば COX-2 inhibitors, thromboxane antagonists、isoprostane receptor antagonists）、iNOS inhibitor 等

【0053】

2. 抗炎症剤：

例えば、Phosphodiesterase 4 inhibitors（例えば SB207499, CP80633, CDP-840）、Adhesion inhibitors（例えば anti-CD11/CD18, anti-ICAM1, E-selectin inhibitors）、Prostaglandin E analogs（例えば misoprostil, butaprost）、サイトカイン（例えば IL-10）、Colchicine、Macrolide antibiotics（例えば erythromycin, clarithromycin, roxithromycin）等

【0054】

3. プロテアーゼインヒビター：

例えば、Neutrophil elastase inhibitors（例えば ICI200355, ONO-5046, MR-889, L658,758）、Cathepsin inhibitors（例えば suramin）、Matrix metalloprotease inhibitors（例えば batimastat, marimastat, KBR7785）、alpha1-antitrypsin（例えば purified, human recombinant, gene transfer）、Secretory leukoprotease inhibitor、Elafin 等

【0055】

4. Immunoregulators：

例えば免疫抑制剤 FK506 等

【0056】

5. 呼吸器炎症疾患又は呼吸器過敏症治療剤：

テオフィリン等のキサンチン誘導体、 β_2 受容体刺激剤、抗コリン剤、抗アレルギー用剤、副腎皮質ホルモン剤及び吸入ステロイド等のステロイド剤等。

【0057】

また、本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤には、その阻害効果や予防又は治療効果を阻害しない範囲で、他の成分を含有させることができ、例えば薬学的に許容される担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、充填剤、増量剤、付湿剤、防腐剤等の添加剤を用いて周知の方法で製剤化することができる。

【0058】

ここに、賦形剤としては、有機系賦形剤及び無機系賦形剤等が挙げられる。

【0059】

本発明のプロテアーゼ阻害剤や疾患の予防又は治療剤は、主に経口投与するためのものであるが、具体的には、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ、もしくはシロップ剤等の形態で、経口投与される。

【0060】

投与形態としては、経口投与のほか、静注等の静脈投与、筋肉内投与、経皮投与、皮内

投与、皮下投与、腹腔内投与、直腸内投与、粘膜投与、吸入等が挙げられるが、静注等の静脈投与が安全かつ血中濃度を一定に保つという点で好ましい。

【0061】

尚、上述のレドックス活性蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、プロテアーゼ阻害剤や COPD 又は免疫不全症候群の予防・治療剤として用いることもできる。また、IL-18 阻害剤がポリペプチドの場合には、IL-18 阻害剤をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、COPD、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防・治療剤として用いることもできる。

【0062】

その際の遺伝子形態としては、DNA の他、RNA、プラスミド、ウイルスベクター等が使用可能であり、一本鎖であっても二本鎖であっても良い。

【0063】

プラスミドを用いる場合、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNA ワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特に DNA ワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0064】

ウイルスベクターを用いる場合、(日経サイエンス, 1994 年 4 月号, 20-45 頁、月刊薬事, 36 (1), 23-48 (1994)、実験医学増刊, 12 (15), (1994)、およびこれらの引用文献等) 等に記載されているように、ウイルスに、目的とする遺伝子を組み込むことによって行うことができる。

【0065】

ウイルスベクターに用いるウイルスとしては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等の DNA ウイルス又は RNA ウイルスが挙げられる。ウイルスの中では、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等が好ましく、特にアデノウイルスが好ましい。

【0066】

遺伝子を実際に医薬として作用させるには、当該遺伝子を直接体内に導入する「*in vivo* 法」の他、ヒトから採集した細胞に当該遺伝子を導入し、その後、遺伝子導入細胞を体内に戻すという、「*ex vivo* 法」等がある〔日経サイエンス, 1994 年 4 月号, 20-45 頁、月刊薬事, 36 (1), 23-48 (1994)、実験医学増刊, 12 (15), (1994)、およびこれらの引用文献等〕が、*in vivo* 法がより好ましい。

【0067】

「*in vivo* 法」により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択することができる。投与経路としては、例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等が挙げられる。

【0068】

「*in vivo* 法」によって投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である遺伝子を含有する注射剤等の形態が好ましく、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。

【0069】

また、遺伝子を含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態として用いることができる。

【0070】

〈本発明の阻害剤や予防又は治療剤を用いた、プロテアーゼ阻害方法、及び COPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療方法〉
本発明のプロテアーゼ阻害剤や COPD 又は免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤を、上記のような様々な形態で投与すること、あるいは、本発明のプロテア

一ゼ阻害剤や COPD、免疫不全症候群、肺胞蛋白症、循環器疾患の予防又は治療剤である遺伝子を、遺伝子治療によって用いることによって、予防又は治療することができる。

【0071】

〈本発明の効果確認に用いる疾患動物モデルの作製方法〉

[伝統的 COPD 動物モデル]

本発明において、COPD 抑制効果の確認のために用いる肺気腫動物モデルは、文献記載の方法を用いることができるが (Shapiro, S. D. Animal models for COPD. Chest, 117: 223S-227S, 2000)、具体的には、例えば清潔 PBS に懸濁した豚エラスターゼを、シリンジで気管内投与すること等によって作製することができる。

【0072】

[新規疾患動物モデル]

本発明において、COPD 抑制効果の確認のために用いる疾患動物モデルとしては、本発明者 (星野, 特願 2004-069835) によって開発された、新たな COPD 動物モデルも用いることができる。この動物モデルは、COPD の他、肺胞蛋白症や循環器疾患の動物モデルとしても使用可能であるが、下記の説明においては、便宜上、COPD 動物モデルと記載することができる。その作製方法を以下に記載する。

【0073】

ここで用いられる COPD 動物モデルとは、肺特異的に発現するプロモーターの制御下にある下記 (X1) 乃至 (Y2) のいずれかの遺伝子を含むことを特徴とする組換え遺伝子を導入した動物モデルである。

(X1) インターロイキン-18 遺伝子

(X2) インターロイキン-18 のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン 18 と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(Y1) カスパーゼ-1 遺伝子

(Y2) カスパーゼ-1 のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつカスパーゼ-1 と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

【0074】

この動物モデルを用いることによって、生後約 5 から 8 週間という短期間で、COPD や肺気腫等の慢性閉塞性肺疾患、肺胞蛋白症等の肺疾患、循環不全 (肝不全、肺性心等の心不全、肺高血圧症) 等の循環器疾患等の循環器疾患を発症することが確認されている。これによって、従来、起炎物となるタバコの繰り返し投与のために 6 ヶ月に亘る長期間を要していた動物モデル作製期間が短縮され、しかもブタエラスターゼやパパイニン等も含めて起炎物の投与を一切行わないで簡便に行うことができる。

【0075】

〈組換え遺伝子〉

この動物モデルに導入する組換え遺伝子は、下記 (X1) 又は (X2) 遺伝子 (以下、併せて「IL-18 遺伝子類」と記載することがある。)、あるいは下記 (Y1) 又は (Y2) 遺伝子 (以下、併せて「カスパーゼ 1 遺伝子類」と記載することがある。) を、肺特異的に発現するプロモーターの制御下に置くことによって、得ることができる。肺特異的に発現するプロモーターとしては、肺構成細胞由来プロモーター等が挙げられ、例えば肺サーファクタントプロモーター又はクララ細胞プロモーター等が挙げられる。

【0076】

(X1) IL-18 遺伝子

(X2) IL-18 のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ IL-18 と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(Y1) カスパーゼ-1 遺伝子

(Y2) カスパーゼ-1 のアミノ酸配列のうち、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換

若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつカスパーゼー 1 と同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

【 0 0 7 7 】

IL-18 と同等の活性とは、IL-18 レセプターを通じたシグナル伝達等を意味し、例えばインターフェロン γ (IFN- γ) を誘導する活性等を意味する。また、カスパーゼー 1 と同等の活性とは、IL-18 前駆体 (プロ IL-18, proIL-18) を切断して、活性型 (成熟型 IL-18, mature IL-18) とする活性を意味する。

【 0 0 7 8 】

肺サーファクタントプロモーターとしては、ヒト肺サーファクタントプロモーター (surfactant protein-C 遺伝子プロモーター。以下、「SPC プロモーター」と記載する。) 等が挙げられる。SPC プロモーターは、例えば Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7. に記載された手法に準じて得ることができる。

【 0 0 7 9 】

クララ細胞プロモーターとしては、CC10 プロモーター (CCSP と言うことがある。) 等が挙げられる。CC10 プロモーターは、例えば cis-acting elements that confer lung epithelial cell expression of the CC10 gene. J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):14703-12. に記載された手法に準じて得ることができる。

【 0 0 8 0 】

これらのプロモーターを用いることで、本発明の疾患動物モデルを効率良く作成することができる。

【 0 0 8 1 】

組換遺伝子は、このほか、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためのシグナルペプチド (SP) 遺伝子や、コザック配列等のタンパク発現を最適化する作用を持つ配列、発現遺伝子の釣り出し等に有用なポリ A 配列等を含んでいることが好ましい。

【 0 0 8 2 】

シグナルペプチドとは、タンパク質が細胞外に分泌される際、その疎水性により脂質で出来た細胞膜を通過するのに役立つアミノ酸配列であり、膜を通過した後、シグナルペプチダーゼと言う酵素で切断されるものである。

シグナルペプチドとしては、例えばマウスの免疫グロブリン (以下「Ig」と記載する。) κ -チェーン・シグナルペプチド等が挙げられる。

マウスの Ig κ -チェーン・シグナルペプチドは、例えば、Carroll, W. L., E. Mendel, S. Levy. 1985. Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript. Mol. Immunol. 25:991.等に記載されている。

【 0 0 8 3 】

コザック配列とは、遺伝子の ATG 開始コドンの周辺で見つかった、細菌由来の、グアニン・シトシンを多く含む DNA 配列で、タンパク発現を最適化する作用をもち、クローニングの際に用いられている配列である。

例えば、Nucleic Acids Res. 1984 Jan 25;12(2):857-72. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. に記載されている。

【 0 0 8 4 】

ポリ A 配列とは、遺伝子中のヌクレオチド配列で、アデニル酸 (A) が連続している部分を言う。

ポリ A 配列としては、牛由来のポリ A 配列等が挙げられる。例えば、Goldman, L. A., E. C. Cutrone, S. V. Kotenko, C. D. Krause, J. A. Langer. 1996. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. BioTechniques 21:1013.等に記載されている。

【 0 0 8 5 】

また、組換遺伝子が (X 1) 又は (X 2) 等の IL-18 遺伝子類を用いたものである場合

には、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためには、シグナルペプチド遺伝子の導入のほか、proIL-18を活性型IL-18に変換するIL-1 β 変換酵素(カスパーゼ-1)遺伝子を、IL-18遺伝子類とともに動物モデルに導入し、共に発現させる方法等、他の公知の技術を用いることもできる。

【0086】

〈疾患動物モデル〉

疾患動物モデルは、例えば次のような方法で、作成することができる。

【0087】

本発明に使用される動物としては、げっ歯類動物、イヌ、ネコ、サル、ウマ、ブタ等が挙げられ、このうち、げっ歯類動物としてはマウス、ラット等が挙げられるが、マウスが好ましく、マウスは、例えば、C57BL/6Nマウス(B6マウスとも言う)、Balb/cマウス等が好ましく用いられ、中でも、B6マウスが好ましい。

【0088】

以下本発明の説明においては、おもに、導入動物がマウスの場合を例に挙げて説明することがあるが、本発明は、マウスに関するものに限定されるものではない。

【0089】

上記を含む組換え遺伝子の作出方法としては、遺伝子組み換えの公知の方法を用いることができるが、例示すると、以下の通りである。尚、以下では主にIL-18遺伝子によって説明するが、上記(X2)のIL-18関連遺伝子や、上記(Y1)、(Y2)のカスパーゼ1遺伝子類の場合も同様に行うことができる。

【0090】

マウスIg κ -チェーンの、V-J2-C領域から取り出したシグナルペプチド(文献(1)Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K. Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. J Immunol 2001;166:7014-7018、文献(2)Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H, Yoshino K. Exacerbated and Prolonged Allergic and Non-Allergic Inflammatory Cutaneous Reaction in Mice with Targeted Interleukin-18 Expression in the Skin. J Invest Dermatol 2003;121:502-509)と、マウスのpro-IL-18 cDNA(上記文献(1)参照)を用い、シグナルペプチドを持つ成熟IL-18 cDNAを、PCR法によって取得する(上記文献(1)、(2)参照)。pro-IL-18 cDNAは、活性型(mature IL-18)になった際に、上記(X)又は(Y)遺伝子となるものであれば良い。

【0091】

シーケンス(DNA配列)を図15及び配列1に例示する。図15(配列1)の配列中、7~9番目にある開始コドン「ATG」の直後の、10番目の配列Gから、69番目の配列Cまでが、マウスIg κ 鎖のV-J2-C領域由来シグナルペプチド遺伝子、その直後の「AAC」コドンから541~543番目の「TAG」STOPコドンの直前の「AGT」コドンまでが、マウスの成熟IL-18 cDNAである。

【0092】

尚、開始コドンの前の、「GGA ACA」は、元々マウスのpro-IL-18 cDNAのゲノムにあった、コザック配列を含む、タンパク発現を最適化する配列領域である。

【0093】

また、STOPコドンの後の「GTG」は、元々マウスのpro-IL-18 cDNAのゲノムにあった配列であるが、特に必要ではないと考えられる。

【0094】

次に、pCR2.1ベクター(Invitrogen製)を用いてPCR産物をクローニングし、シーケンスする(上記文献(1)、(2)参照)。続いてヒトサーファクタントのプロモーターSPC(Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.)、SV40 small T intron(Early

restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10482-7.)と牛由来ポリ A (Goldman, L. A., E. C. Cutrone, S. V. Kotenko, C. D. Krause, J. A. Langer. 1996. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. BioTechniques 21:1013.)を含む 3.7SPC/SV40 ベクター (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, August 6, 2002 vol. 99 no. 16 10482-10487) で、EcoRI [New England Biolabs (MA, USA)] で切り出して EcoRI サイトに組み込む方法によってサブクローニングし、SPC-IL-18SP とする (図 16)。

【0095】

SPC-IL-18SP を NdeI [New England Biolabs (MA, USA)] と NotI [New England Biolabs (MA, USA)] の制限酵素部位で 37℃、2 時間以上で (New England Biolabs (MA, USA) のプロトコールに準ずる) 切断することによって、直鎖状 DNA フラグメントを得ることができる。

【0096】

組換え遺伝子をマウスに導入する方法としては、公知の遺伝子導入方法を用いることができるが、例えば、マウスの受精卵に上述のようにして得られた組換え遺伝子 (上述の直鎖状 DNA フラグメント) をマイクロインジェクション法 (注入時期: 前核期受精卵, 注入箇所: 雄生前核) にて注入し、代理母マウスの卵管に挿入して作製した SPC-IL-18TG マウス (founder) を得る。組換え遺伝子注入の確認は、生まれたマウス (ファウウンダー) の尾部等の組織から DNAeasy kit [Qiagen, Germany] 等を用いて、DNA を抽出し、PCR で確認できる。雄性の野生型のマウス (代理母と同系で無いもの) と掛け合わせ、その子孫 (雌雄どちらでも可。F2, F3, ... を含む) のうち、IL-18 を発現しているものを選別することで、組換え遺伝子導入の作製を行うことができる。選別する方法としては、尾部等の組織のゲノム DNA を用いた PCR 分析, 血清中の成熟 IL-18 の ELISA 分析, 肺や心臓, 肝臓等における、成熟 IL-18 のウェスタンブロッティング分析等が挙げられる (上記文献(1), (2) 参照)。

【0097】

肺特異的に発現するプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子) の導入量は、マウスの種類や発症させたいタイミング, 発症させたい程度等にて合わせて、適宜調節することができ、特に限定されるものではないが、一般的には、マウスの肺で 1 ng/lung 以上 (50 ng/kg 体重), 10 ng/lung 以下 (500 ng/kg 体重) が適当と考えられる。

【0098】

動物モデルにおける IL-18 発現が、例えばマウス血清中の成熟 IL-18 の ELISA 分析で 1 ng/mL 以上、10 ng/mL 以下となる程度に導入することが好ましい。導入量が多いほど、上記の標的とする肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。本モデル動物においては、同時に様々な疾患が発症し得るが、例えば肺疾患と心疾患では、病巣が異なるので、スクリーニングに当たって、いずれの部位に効く薬かは、区別可能である。また、疾患部位が同じ病気の場合でも、それぞれ特徴となる病態が異なるため、いずれの疾患の薬剤候補となり得るかは個々の臓器を解析することで判断可能である。

【0099】

SPC-IL-18 導入から発症までの時期は、特に限定されるものではないが、早ければ 4 週齢前後から発症し始め、5 週齢前後で殆どが発症し、高齢になるほど強い症状が現れる傾向にある。早い段階では、発症する疾患の種類やその出方に差があるが、5 から 8 週齢前後で、上記の肺疾患や循環器疾患の殆どが発症する傾向にある。

【0100】

上記のようにして得られた疾患動物モデルは、慢性閉塞性肺疾患, 肺胞蛋白症等の肺疾患や、肺性心等の心不全, 肝不全、肺高血症等の循環不全を含む、循環器疾患動物モデルとして有用であり、この動物モデルを用いることによって、これら疾患の予防又は治療剤のスクリーニングが可能となる。

【実施例 1】

【0101】

[試験管レベルでのTRXによる、プロテアーゼ抑制確試験]

TRXによる、カスパーゼ-1, MMP-1, MMP-9の抑制効果を調べた。

アッセイ方法:

【0102】

〈カスパーゼ-1〉

Thornberry NA (Nature 356(30):768-775, 1992)に準じて行った。つまりリコンビナントヒトカスパーゼ-1を用い基質は $20 \mu\text{M}$ Ac-YVAD-AMC、 37°C 3 時間反応させAMC (7-amino-4-methylcoumarin) の蛍光量で2回定量した(MDS Pharma Services Japan, 京都に測定委託)。

【0103】

〈MMP-1, 9〉

リコンビナントMMP-1 (ペプチド研究所, 京都), リコンビナントMMP-9 (ペプチド研究所, 京都) を用い基質は $50 \mu\text{M}$ P3163-v (ペプチド研究所, 京都): MOCAc-Pro-Leu-Gly+Leu-Azpr(DNP)-Ala-Arg-NH₂、 37°C で2時間反応させ、蛍光量で2回定量した。

【0104】

〈試験結果〉

精製TRX $100 \mu\text{g/mL}$ の存在下で、カスパーゼ-1は21%抑制された。また精製TRX $100 \mu\text{g/mL}$ の存在下でMMP-1, MMP-9がそれぞれ47%、76%抑制された。

このことから、TRXには、システインプロテアーゼやメタロプロテアーゼ等のプロテアーゼの抑制効果があることが確認された。

【実施例2】

【0105】

[伝統的動物モデルを用いた、TRXのCOPD抑制効果実験]

上述した、エラスターゼを用いた伝統的なCOPD動物モデルを使って、COPD治療剤の効果を確かめる実験を行った。8週齢C57BL/6Nマウスを下記1~4の各群について5匹ずつ用いた。

【0106】

(第1群) DAY 1に、清潔PBS $100 \mu\text{L}$ をシリンジで気管内投与した群(参考例: controlマウス)。

(第2群) DAY 1に、清潔PBS $100 \mu\text{L}$ に懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製、0.3U)をシリンジで気管内投与した群(比較例1: 病態マウスモデル1)。

(第3群) DAY 0からDAY 20まで隔日で、TRX投与のコントロールとして清潔PBS $100 \mu\text{L}$ に懸濁した卵白アルブミン(OVA, SIGMA社製、 $40 \mu\text{g}$)を腹腔内投与し、清潔PBS $100 \mu\text{L}$ に懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)を、DAY 1にシリンジで気管内投与した群(比較例2: 病態マウスモデル2)。

(第4群) DAY 0からDAY 20まで隔日で、清潔PBS $100 \mu\text{L}$ に懸濁したヒトリコンビナントTRX ($40 \mu\text{g}$)を腹腔内投与し、清潔PBS $100 \mu\text{L}$ に懸濁した豚エラスターゼ(SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)をDAY 1にシリンジで気管内投与した群(実施例2: 病因+治療剤投与マウス)。

【0107】

すべてのマウスはDAY 21で回収した。20%中和ホルマリンを気管支から15 cmH₂O圧をかけてマウス肺を還流固定。肺パラフィン切片はHE染色した。顕微鏡画像は顕微鏡用デジタルカメラDXM1200 (NIKON製) で取り込み、解析ソフトはACT-1 (NIKON製)、Photoshop (Adobe社製) で用いた。具体的には各群からランダムに肺組織(スライド)を選ぶ。一匹のマウスの両肺から左右の上肺野、中肺野と下肺野の計6断面のHE染色スライドから各断面5視野の画像をACT-1で取り込む。Photoshop (Adobe社製) を用いて各視野で300マイクロメートルのグリッド(線) 4つ引く。肺胞がこのグリッドを横切った数を数える。例えば3回横切ると平均の肺胞の

長さ (mean linear intercept: Lm) は 300 マイクロメートル/3=100 マイクロメートルである。一匹のマウスの Lm を 6 断面 x 5 視野 x 4 グリッド (線) = 120 グリッド (線) から求め各群の平均及び Welch の t 検定で統計解析を行った。

【0108】

組織学的に (第 1 群: control マウス) には肺に有意な変化はなかった (図 1)。

【0109】

一方、(第 2 群: 病態マウスモデル 1) には著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的 COPD が出来た (図 2)。

【0110】

また、(第 3 群: 病態マウスモデル 2) は、著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的 COPD が出来るが、第 2 群と差がなかった。つまりレドックス蛋白でないコントロール蛋白である OVA の腹腔内投与では COPD の発症は抑制されないことが判明した (図 3)。

【0111】

(第 4 群: 病因 + 治療剤投与マウス) では、肺に変化は少なく、TRX が実験病理学的 COPD を強力に抑制することが分かった (図 4)。

【0112】

そこで、これら HE 染色スライドを用いて画像解析を行い、Lm を求めたところ、第 1 群、第 2 群、第 3 群、第 4 群の Lm の平均はそれぞれ 31.7, 69.0, 82.0, 30.4 マイクロメートルだった (図 5)。

【0113】

Lm を計測すると、第 4 群 (病因 + 治療剤投与マウス) は、第 2 群 (病態マウスモデル 1, $p=2.62 \times 10^{-24}$)、第 3 群 (病態マウスモデル 2, $p=4.00 \times 10^{-20}$) に比べ有意に COPD を統計学的有意に抑制した。

【0114】

一方、第 4 群 (病因 + 治療剤投与マウス) は、第 1 群 (control マウス) に比べ Lm に有意差はなかった。

【0115】

実験の結果、この系を用いてレドックス活性蛋白質である TRX が、実験病理学的 COPD を強力にかつ統計学的有意に抑制することが確認された。

【0116】

また、レドックス活性蛋白質が、エラスターゼによって誘導される肺気腫動物モデルを抑制することから、このレドックス活性蛋白質が、エラスターゼ阻害剤として機能していることが確認された。つまり、実施例 1 の結果と考え併せると、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子が、エラスターゼに代表されるセリンプロテアーゼやメタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ等のプロテアーゼを阻害する効果を有することは明らかである。

【実施例 3】

【0117】

[新規動物モデルを用いた、TRX の実験病理学的 COPD モデル抑制効果実験]

上述した新規 COPD 動物モデルを使って、COPD 治療剤の効果を確認する実験を行った。上述の様に作製した、7 から 8 週齢の SPC-IL-18TG マウス (各群 5 匹) に、隔日で 0.1mL の無菌のリン酸緩衝液 (PBS) (コントロール) もしくは 0.2mL に溶解したリコンビナントヒト TRX 400 μ g/mL (つまり一匹あたり 40 μ g) を腹くう内投与した。21 日後にマウス肺を回収し、肺組織を HE 染色した。

【0118】

結果を図 6, 7 に示す。その結果、PBS を投与したコントロール (図 6) では、実験病理学的 COPD モデルが発症していたのに対し、TRX 投与群 (図 7) では、COPD や肺胞蛋白症は見られず、また HE 染色で肺動脈が肥厚していないことや肺に著明なうっ血がないことからこのマウスの心臓は、心不全等の循環器疾患等の症状が改善したと判断される。

【0119】

上記のマウスモデルは、肺特異的に IL-18 を発生させることにより、疾患を発症させるものである。そして、TRX には IL-18 阻害作用が知られており、これらのことから、IL-18 のシグナルを抑制すると、COPD を初めとする、上記のマウスモデルの呈する疾患の予防又は治療が可能となることは明らかである。つまり、抗 IL-18 抗体等の上述の IL-18 抑制剤も、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全あるいは肺高血圧症を伴う循環不全等の循環器疾患等の治療剤となることが分かった。

【参考例 1】

【0120】

[COPD 患者の病変局所における IL-18 の強発現]

COPD 患者 10 人の外科手術で得た組織及び交通事故等で亡くなった人等の 6 人の肺組織をホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。抗ヒト IL-18 抗体(clone8)で免疫組織染色を行った。

【0121】

結果を、図 8～10 に示す。

「Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31:619-625, 2004.」に報告してあるように、健常人の肺にはほとんど発現していない(図 8)。

【0122】

その一方、COPD 患者の肺病変部には、IL-18 が強く発現していた。特に浸潤炎症細胞、肺胞上皮に強く発現していることが確認された(図 9, 10)。

このことは、肺での IL-18 の過剰発現が、COPD の病因であることを裏付けるものである。

【参考例 2】

【0123】

[2.1 COPD 患者の病変局所における TRX の強発現]

COPD 患者 10 人の外科手術で得た組織及び交通事故等で亡くなった人等の 6 人の肺組織を、ホルマリン固定しパラフィン切片を作製した。抗ヒト TRX 抗体(Serotec 製)で免疫組織染色を行った。免疫組織染色は以下の論文の方法に従った。

Kitasato, Y., Hoshino, T., Okamoto, M., Kato, S., Koda, Y., Nagata, N., Kinoshita, M., Koga, H., Yoon, D. Y., Asao, H., Ohmoto, H., Koga, T., Rikimaru, T., and Aizawa, H. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31:619-625, 2004.

【0124】

その結果を、図 11～14 に示す。健常者の肺胞上皮には、TRX は、弱くしか発現していなかった(図 11, 12)。

これに対して、COPD 患者の肺病変部には、TRX が強く発現していた。特に浸潤炎症細胞、肺胞上皮や気管支の繊維芽細胞に強く発現していることが確認された(図 13, 14)。

【0125】

参考例 1, 2 の結果からも、COPD で過剰に発現する IL-18 を抑制するために、生体が TRX を発現させている可能性が裏付けられ、上述の IL-18 阻害剤もまた COPD の予防又は治療剤で有用であることが裏付けられた。

【産業上の利用可能性】

【0126】

本発明のレドックス活性蛋白質又はその遺伝子を含むプロテアーゼ阻害剤、及び COPD の予防又は治療剤は、COPD を強力に抑制すること、及び免疫不全症候群の治療の為に、単独であるいは HAART 療法等のカクテル療法に用いられるプロテアーゼとして使用可能である。また本発明の IL-18 阻害剤又はその遺伝子を含む疾患の予防又は治療剤は、COPD、肺胞蛋白症、心不全や肝不全又は肺高血圧症等を伴う循環不全等の循環器疾患を効果的に

治療することができる。

【配列表】

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項1】 下記（１）乃至（４）から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤。

（１）レドックス活性蛋白質

（２）レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質

（３）（１）をコードする遺伝子

（４）（２）をコードする遺伝子

【請求項2】 プロテアーゼがメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼから選択されるものである、請求項1記載のプロテアーゼ阻害剤。

【請求項3】 下記（１）乃至（４）から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤。

（１）レドックス活性蛋白質

（２）レドックス活性蛋白質のアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつレドックス活性蛋白質と同等の活性を有するタンパク質

（３）（１）をコードする遺伝子

（４）（２）をコードする遺伝子

【請求項4】 下記（５）乃至（８）から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。

（５）インターロイキン18阻害剤

（６）インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

（７）（１）をコードする遺伝子

（８）（２）をコードする遺伝子

【請求項5】 下記（５）乃至（８）から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、肺胞蛋白症の予防又は患治療剤。

（５）インターロイキン18阻害剤

（６）インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

（７）（１）をコードする遺伝子

（８）（２）をコードする遺伝子

【請求項6】 下記（５）乃至（８）から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、循環器疾患の予防又は治療剤。

（５）インターロイキン18阻害剤

(6) インターロイキン18阻害剤のアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつインターロイキン18阻害活性を有するタンパク質

(7) (1) をコードする遺伝子

(8) (2) をコードする遺伝子

【書類名】要約書**【要約】**

【課題】新たなプロテアーゼ阻害剤，慢性閉塞性肺疾患・免疫不全症候群・肺胞蛋白症・循環器疾患の根治的治療薬及び治療法を提供すること。

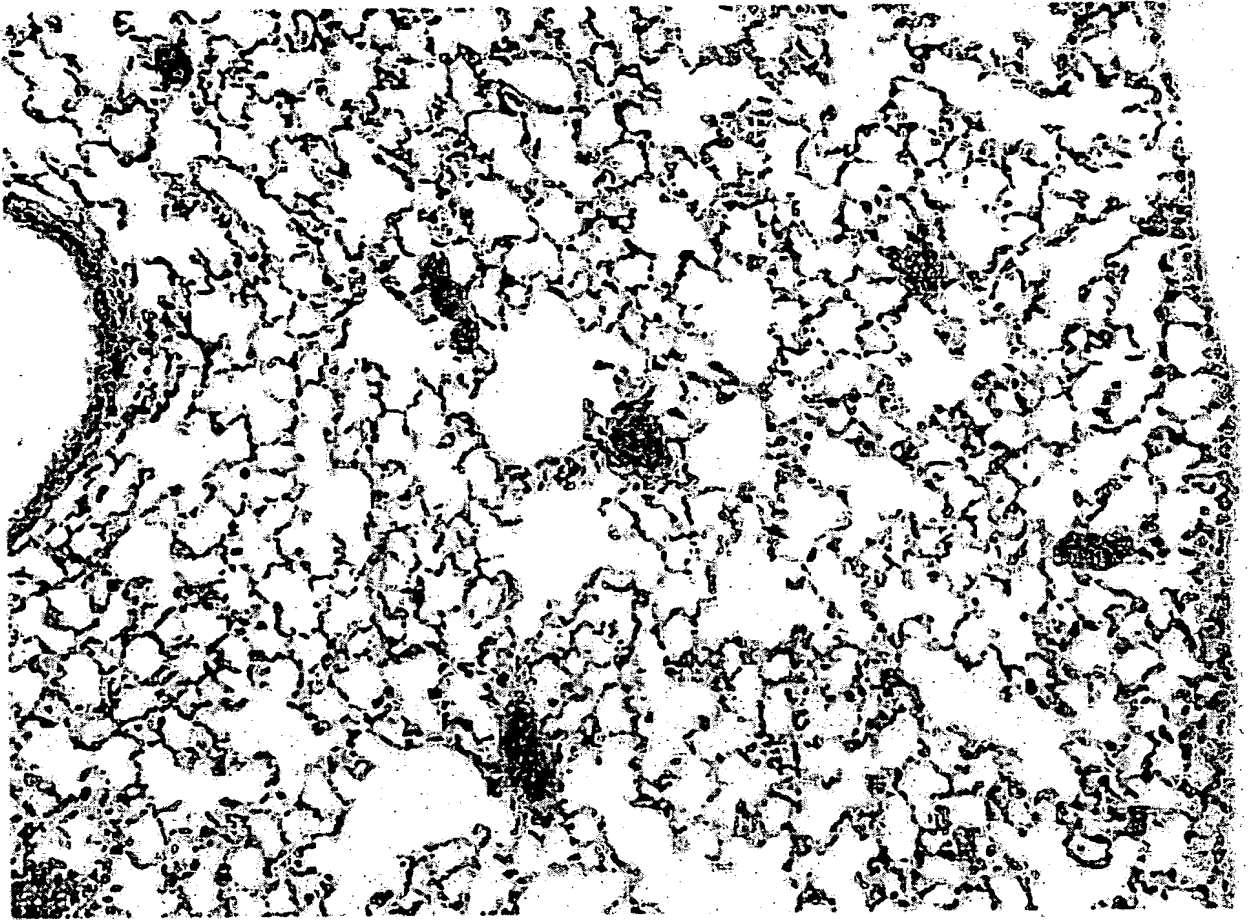
【解決手段】レドックス活性蛋白質，又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤，及び慢性閉塞性肺疾患又は免疫不全症候群の予防又は治療剤，並びに、IL-18 又はこれをコードする遺伝子から選択される少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患・肺胞蛋白症・循環器疾患の予防又は治療剤である。

【選択図】なし

【書類名】図面

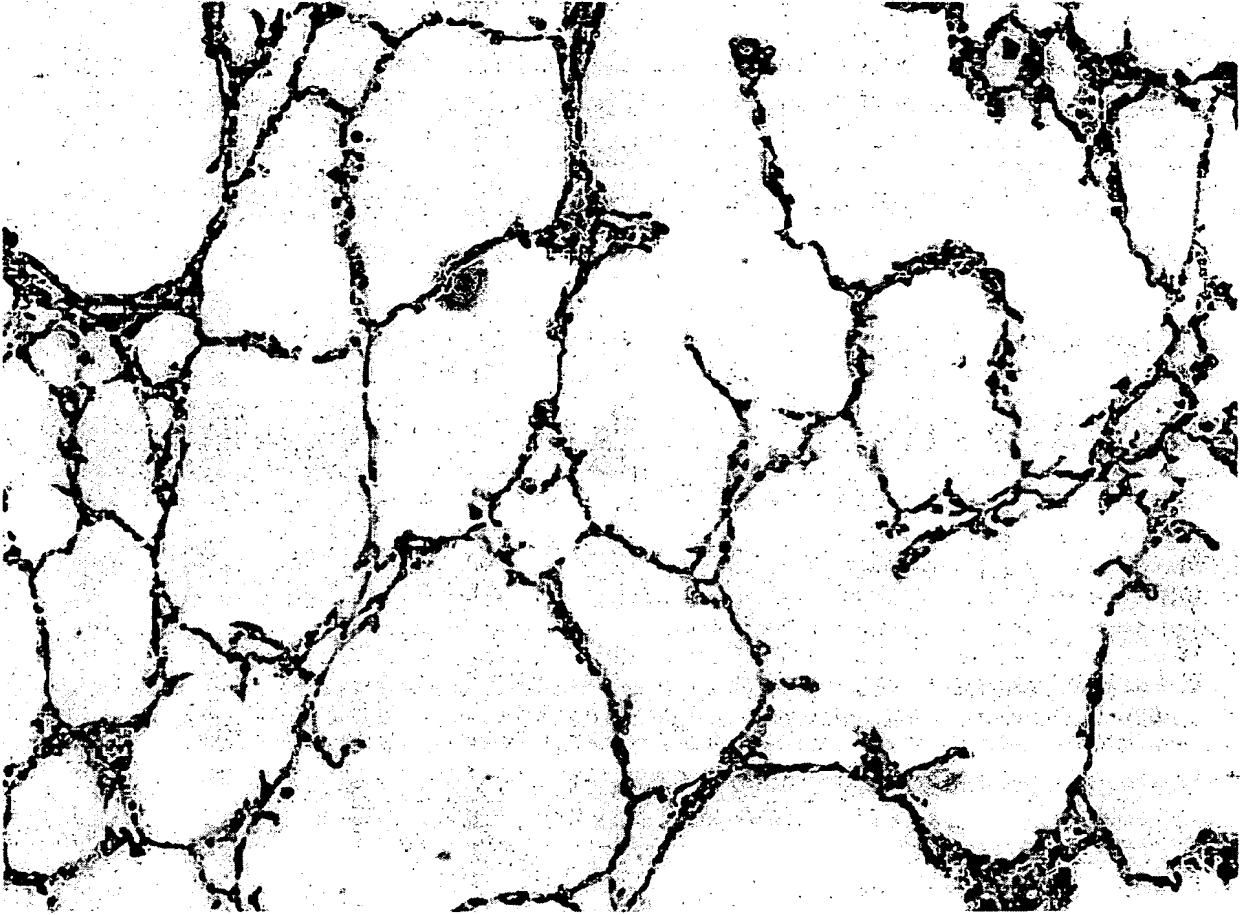
【図1】

HE染色, $\times 40$ 倍



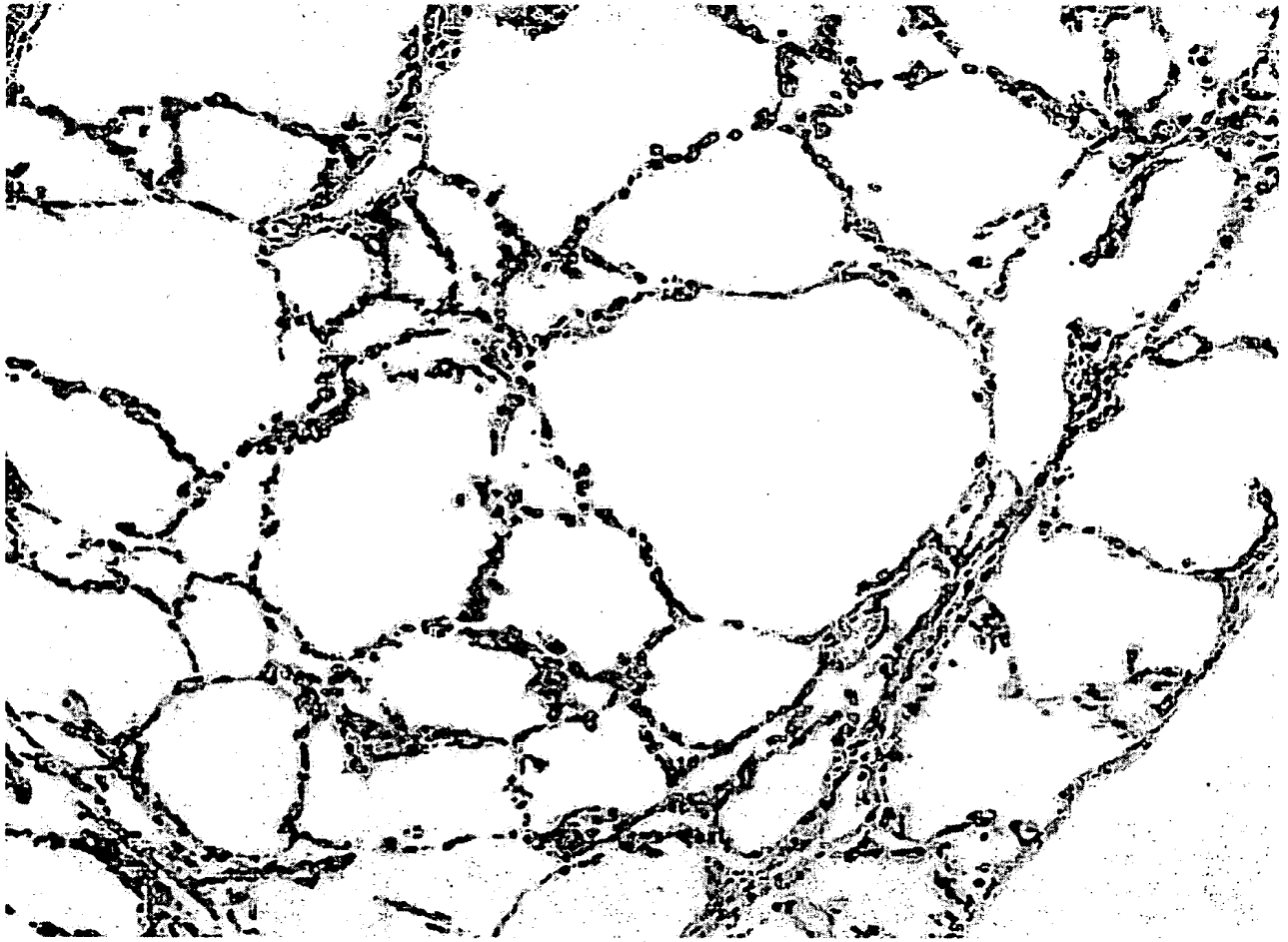
【图2】

HE染色，×40倍

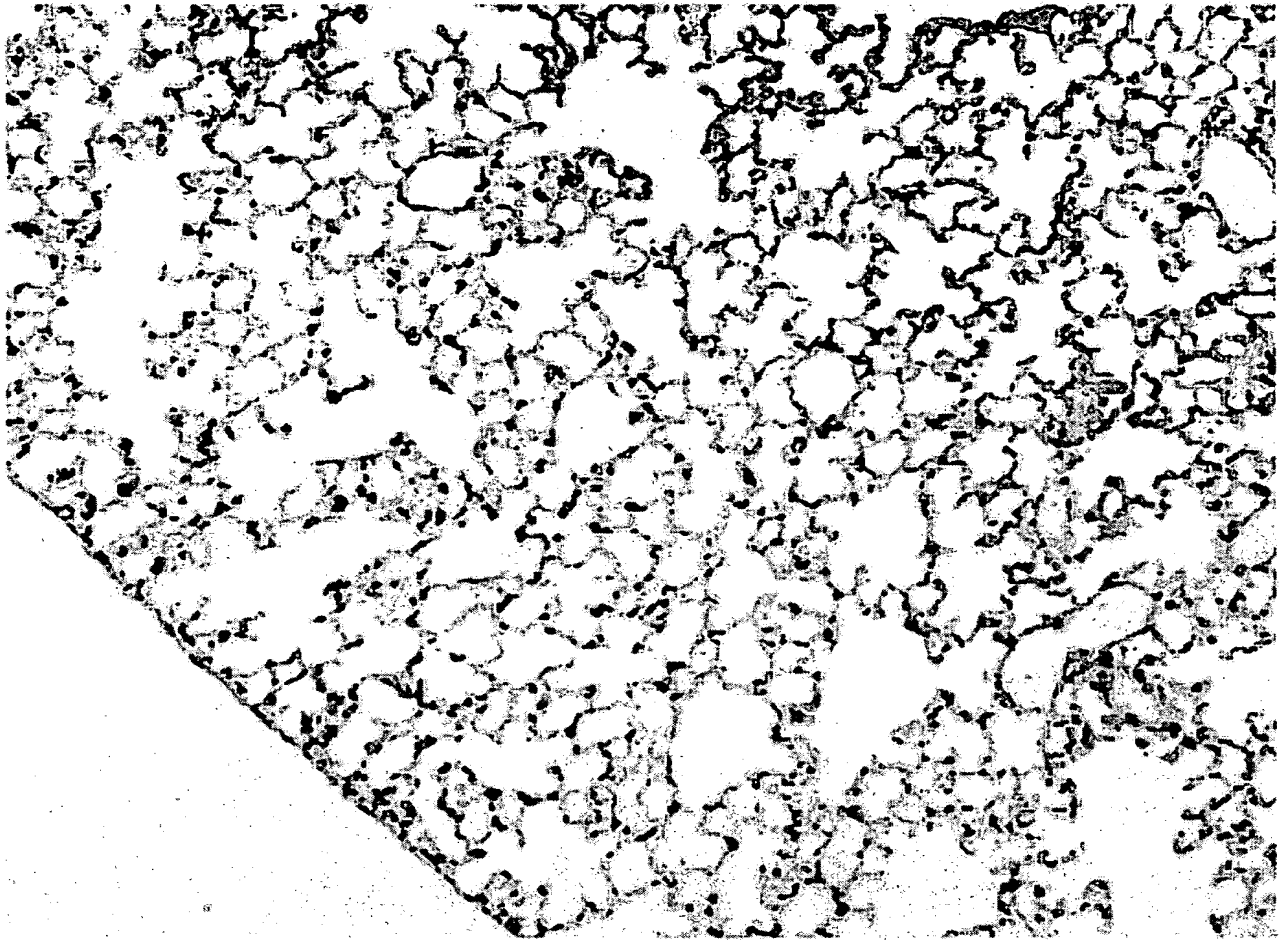


【图3】

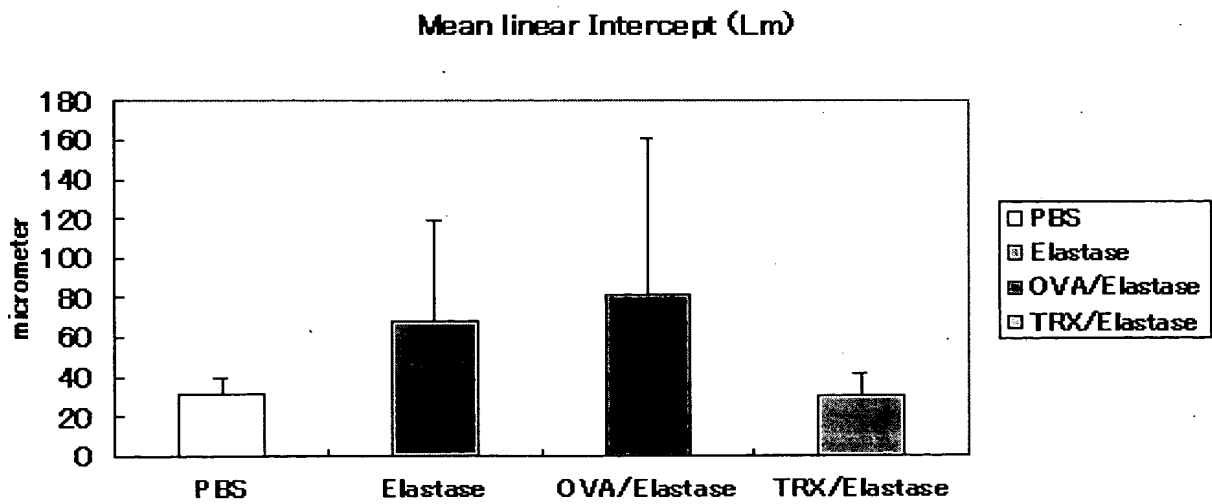
HE染色，×40倍



【図 4】

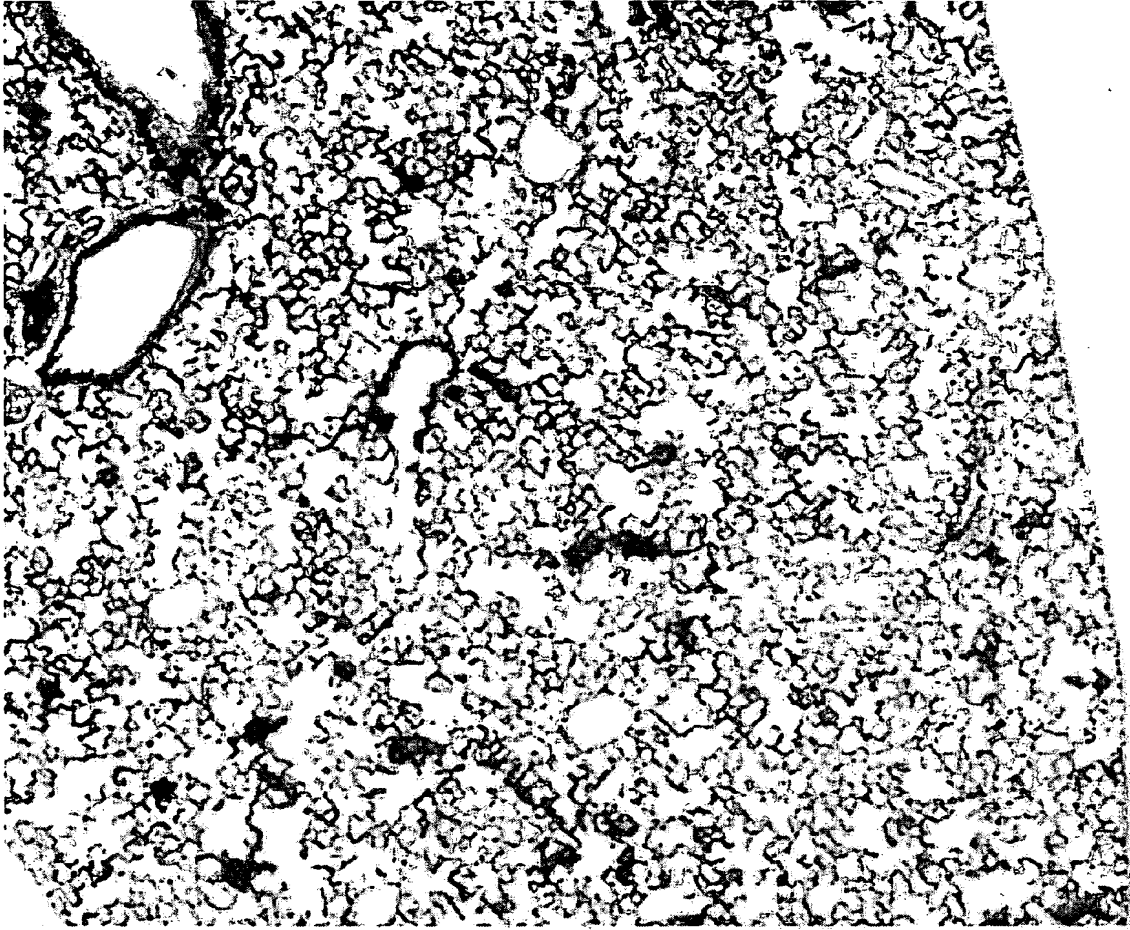
HE染色, $\times 40$ 倍

【図 5】

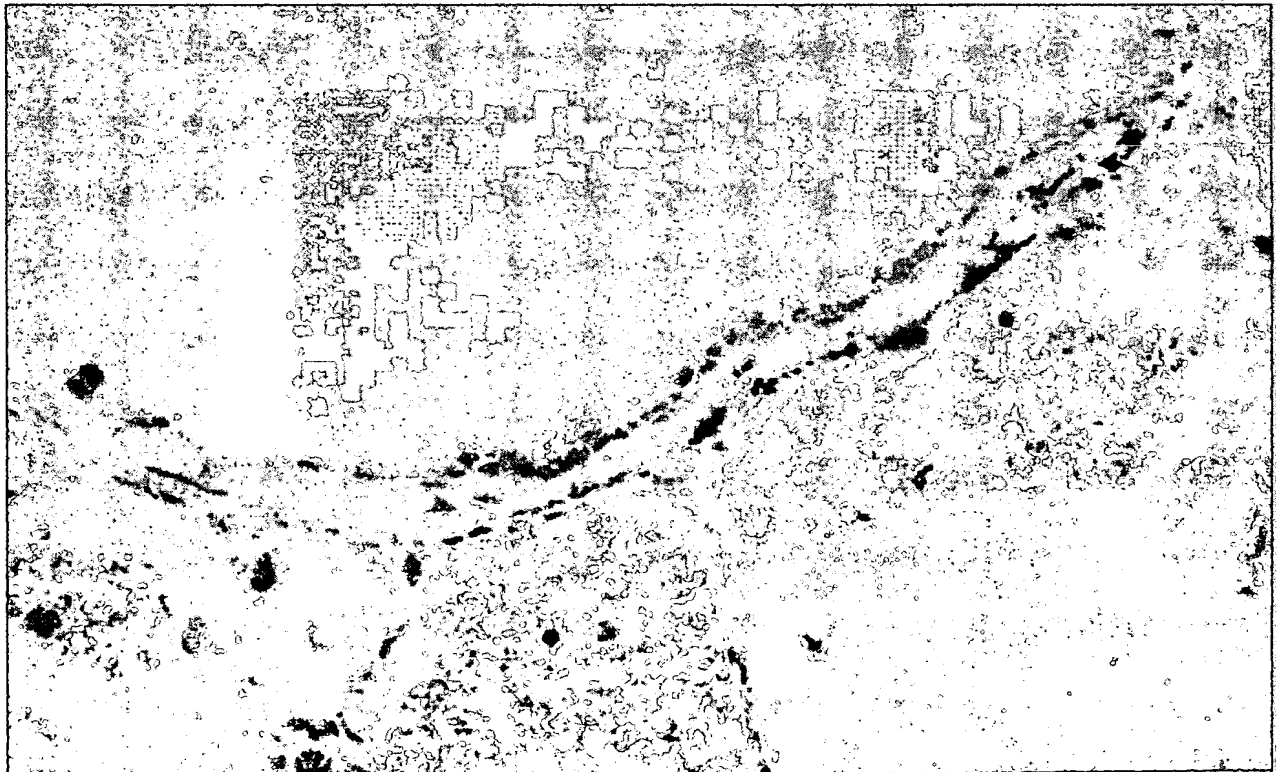




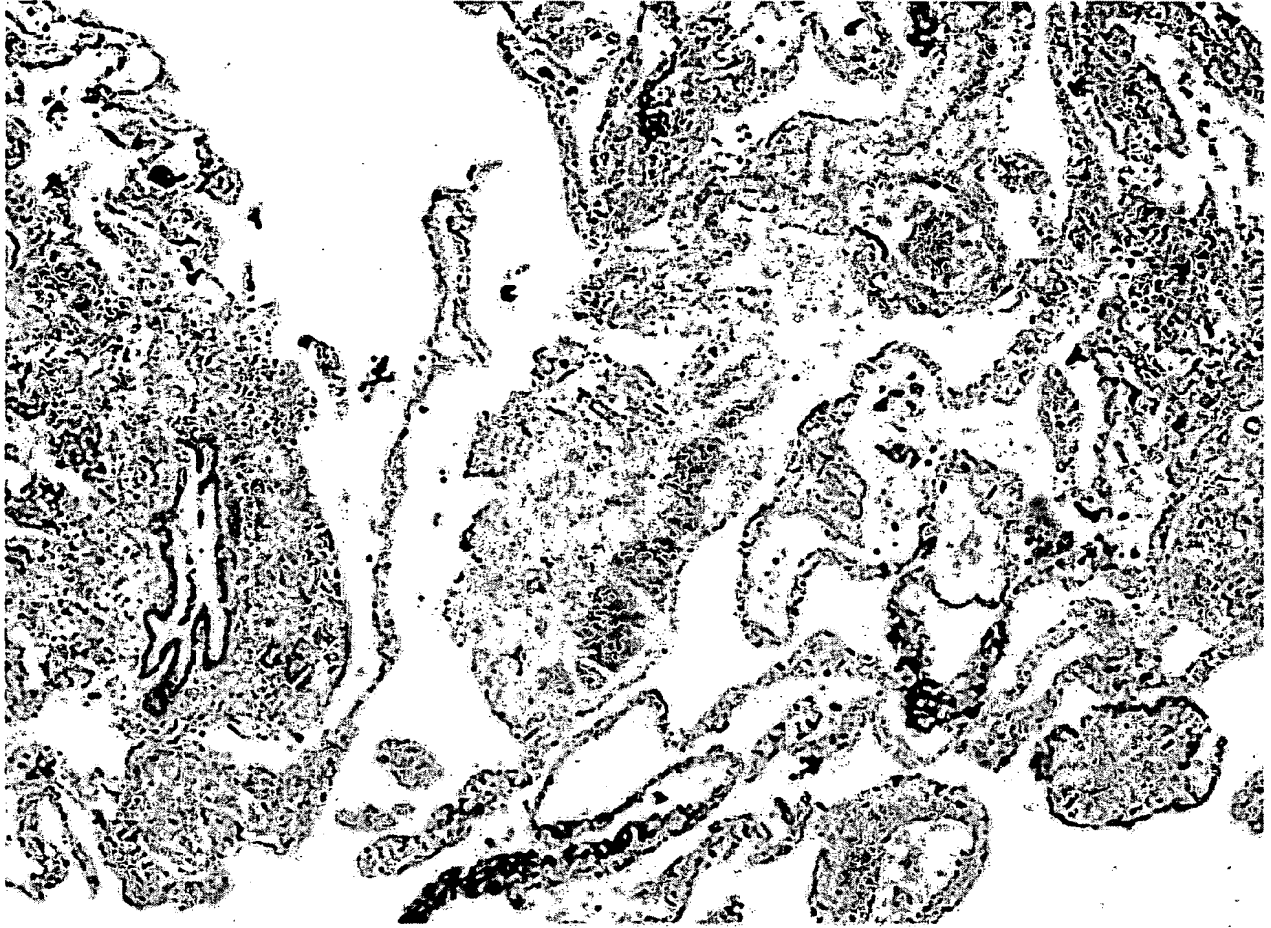
【図 7】



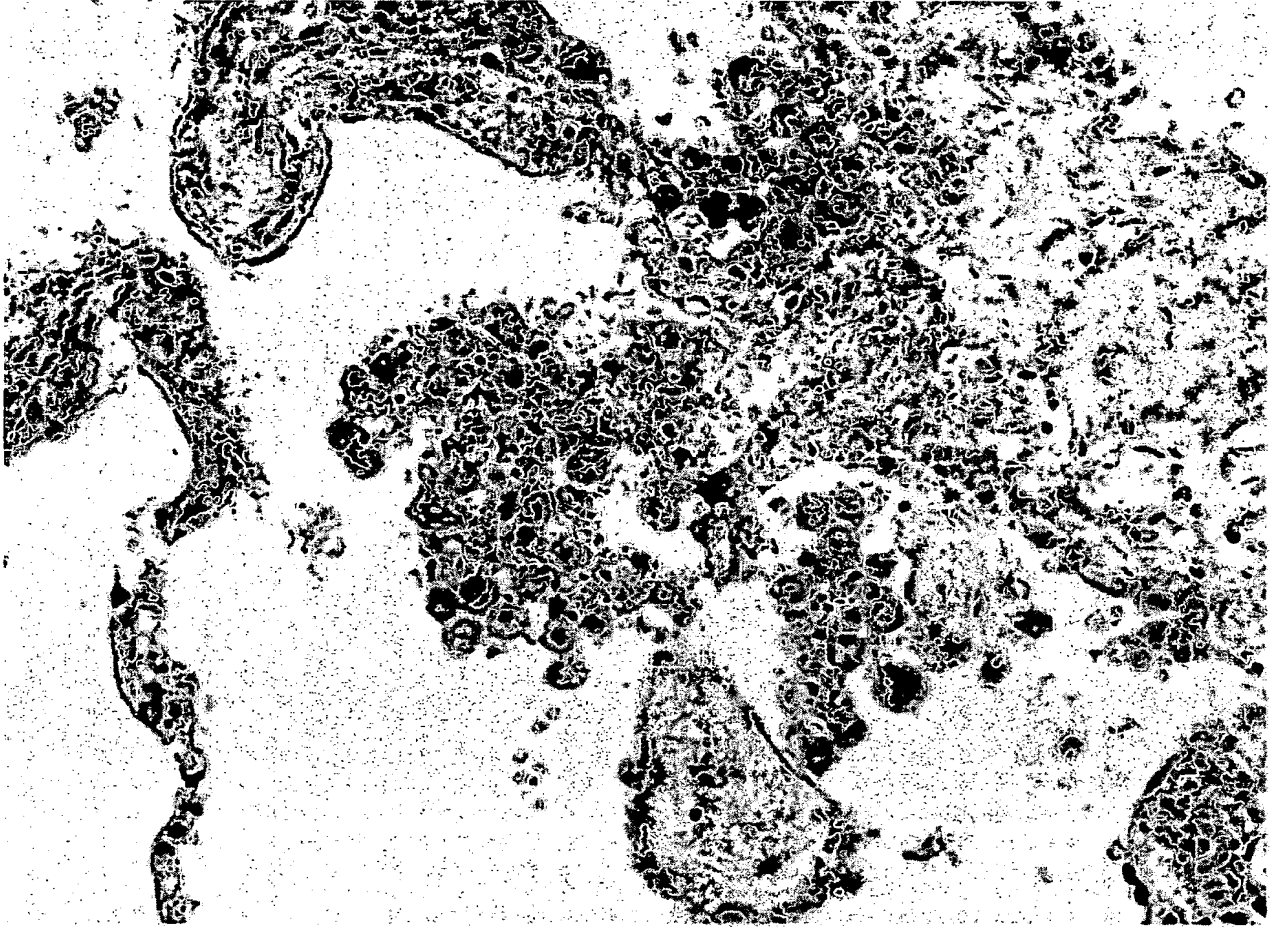
【図 8】



【图9】



【図 10】



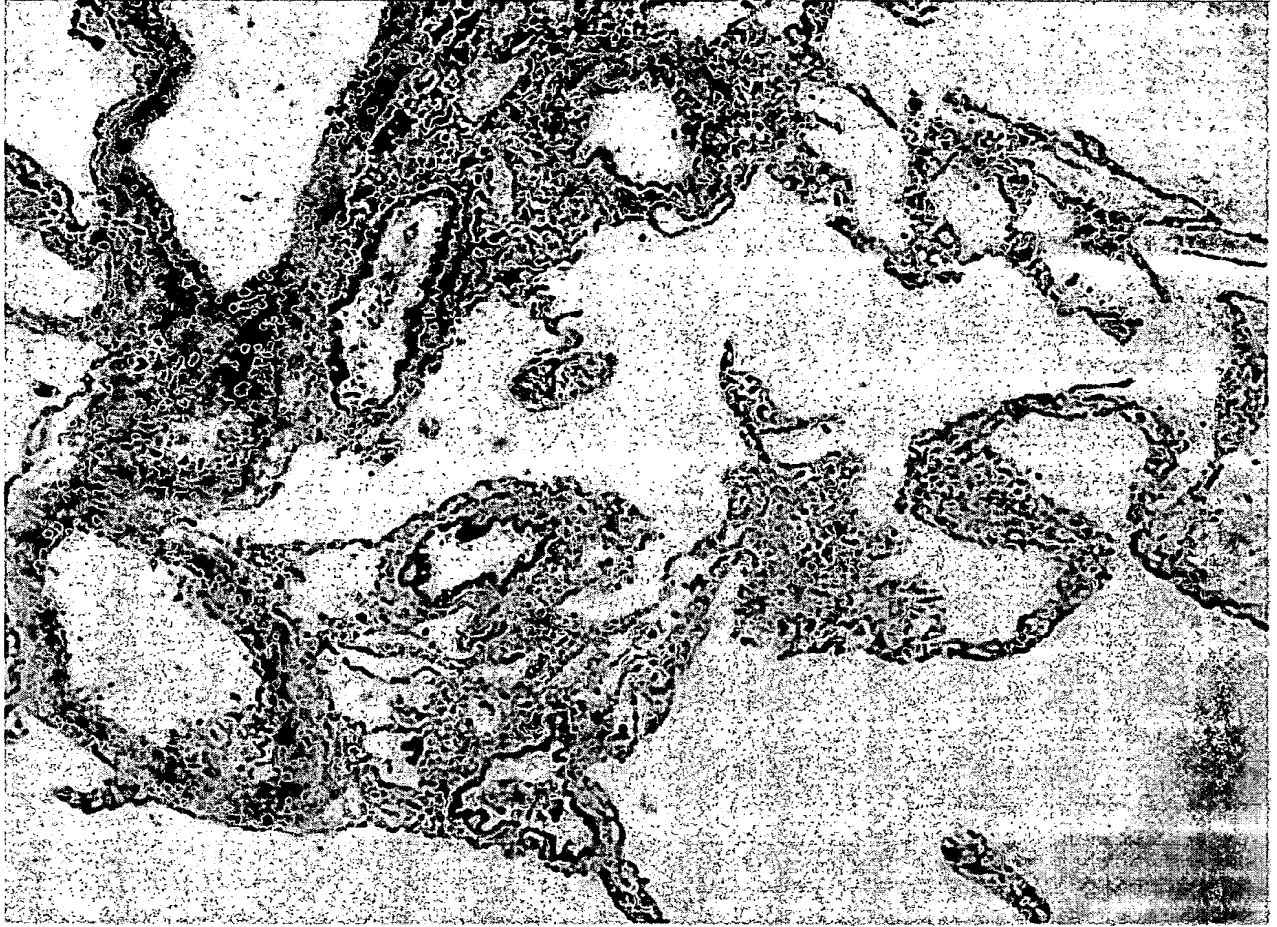
【図 11】



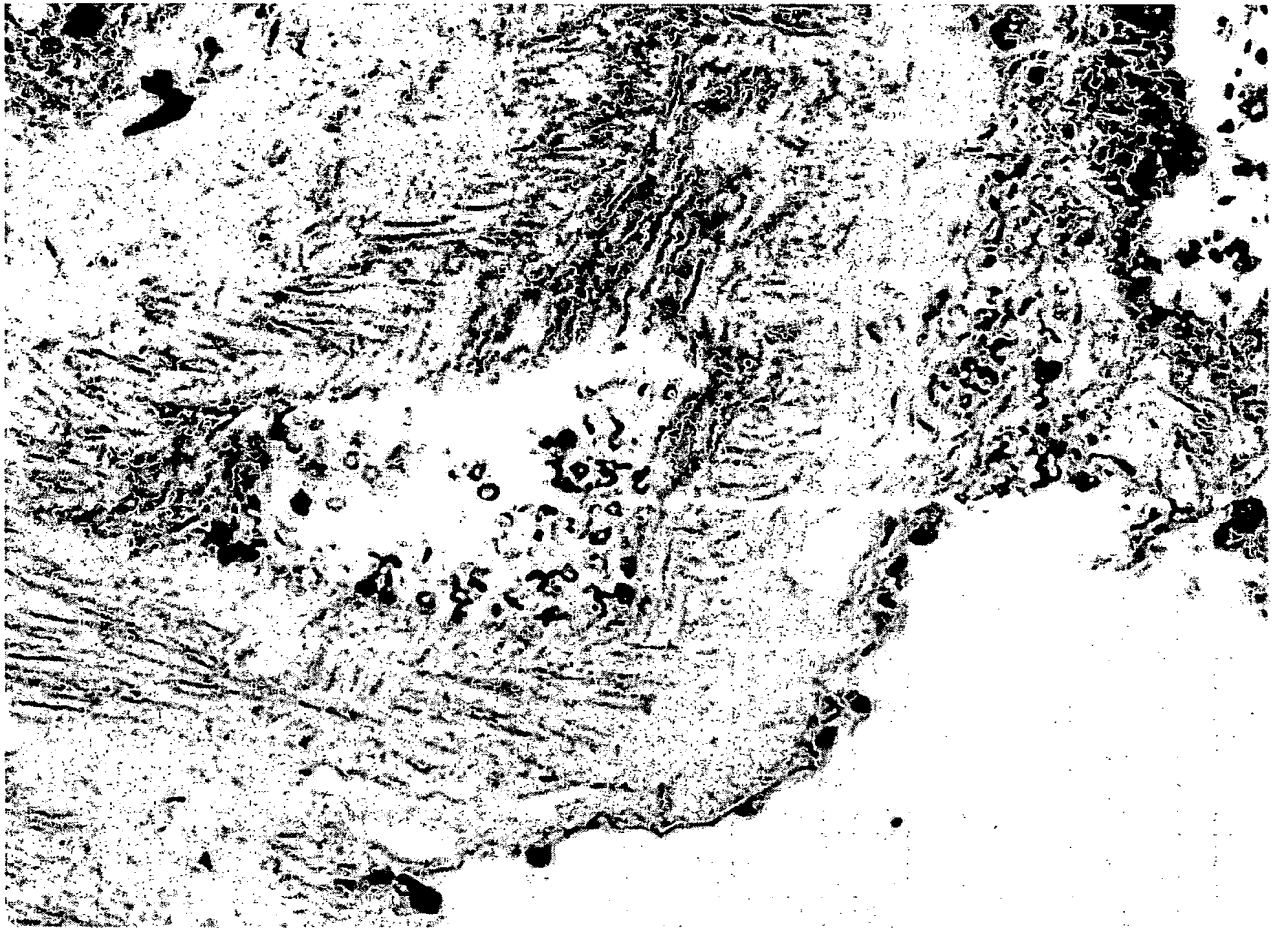
【图 1 2】



【图 13】



【図 1 4】

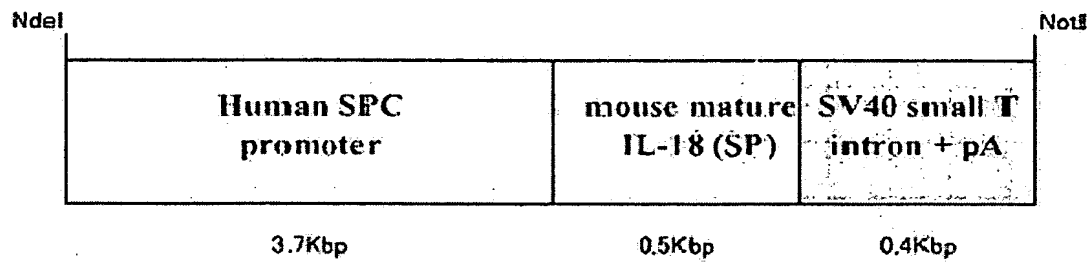


【図 1 5】

シグナルペプチドを持つマウス成熟 IL-18c DNAの塩基配列 (transgene)

1	GGAACAATGG AGACAGACAC ACTCCTGCTA TGGGTACTGC TGCTCTGGGT	50
51	TCCAGGTTCC ACTGGTGACA ACTTTGGCCG ACTTCACTGT ACAACCGCAG	100
101	TAATACGGAA TATAAATGAC CAAGTTCTCT TCGTTGACAA AAGACAGCCT	150
151	GTGTTGAGG ATATGACTGA TATTGATCAA AGTGCCAGTG AACCCAGAC	200
201	CAGACTGATA ATATACATGT ACAAAGACAG TGAAGTAAGA GGACTGGCTG	250
251	TGACCCTCTC TGTGAAGGAT AGTAAAATGT CTACCCTCTC CTGTAAGAAC	300
301	AAGATCATTT CCTTTGAGGA AATGGATCCA CCTGAAAATA TTGATGATAT	350
351	ACAAAGTGAT CTCATATTCT TTCAGAAACG TGTTCCAGGA CACAACAAGA	400
401	TGGAGTTTGA ATCTTCACTG TATGAAGGAC ACTTTCTTGC TTGCCAAAAG	450
451	GAAGATGATG CTTTCAAACT CATTCTGAAA AAAAAGGATG AAAATGGGGA	500
501	TAAATCTGTA ATGTTCACTC TCACTAACTT ACATCAAAGT TAGGTG	546

【図 16】

SPC-IL-18SP の構造図 (schematic design)

SP: signal peptide
pA: polyA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.